

---

---

**Lait — Dénombrement des micro-organismes — Méthode de l'anse calibrée en boîtes de Petri à 30 °C**

*Milk — Enumeration of microorganisms — Plate-loop technique at 30 °C*

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 8553:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ebc4dcc-9743-4f25-b66d-997d92989f06/iso-8553-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ebc4dcc-9743-4f25-b66d-997d92989f06/iso-8553-2004>



Numéros de référence  
ISO 8553:2004(F)  
FIL 131:2004(F)

**PDF – Exonération de responsabilité**

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO et la FIL déclinent toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO et les comités nationaux de la FIL. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central de l'ISO à l'adresse donnée ci-dessous.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 8553:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ebc4dcc-9743-4f25-b66d-997d92989f06/iso-8553-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ebc4dcc-9743-4f25-b66d-997d92989f06/iso-8553-2004>

© ISO et FIL 2004

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit soit de l'ISO soit de la FIL, à l'une ou l'autre des adresses ci-après.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Fédération Internationale de Laiterie  
Diamant Building • Boulevard Auguste Reyers 80 • B-1030 Bruxelles  
Tel. + 32 2 733 98 88  
Fax + 32 2 733 04 13  
E-mail [info@fil-idf.org](mailto:info@fil-idf.org)  
Web [www.fil-idf.org](http://www.fil-idf.org)

Version française parue en 2006

Publié en Suisse

## Avant-propos

L'ISO (**Organisation internationale de normalisation**) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 8553|FIL 131 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et la Fédération internationale de laiterie (FIL), en collaboration avec l'AOAC International. Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL et séparément par l'AOAC International.

[ISO 8553:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ebc4dcc-9743-4f25-b66d-997d92989f06/iso-8553-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ebc4dcc-9743-4f25-b66d-997d92989f06/iso-8553-2004>

## Avant-propos

La **FIL (Fédération internationale de laiterie)** est une fédération mondiale du secteur laitier avec un Comité National dans chacun de ses pays membres. Chaque Comité National a le droit de faire partie des Comités permanents de la FIL auxquels sont confiés les travaux techniques. La FIL collabore avec l'ISO pour l'élaboration de méthodes normalisées d'analyse et d'échantillonnage pour le lait et les produits laitiers.

Les projets de Normes internationales adoptés par les Équipes d'Action et les Comités permanents sont soumis aux Comités Nationaux pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 50 % au moins des Comités Nationaux de la FIL votants.

L'ISO 8553|FIL 131 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers* et la Fédération internationale de laiterie (FIL), en collaboration avec l'AOAC International. Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL et séparément par l'AOAC International.

Tous les travaux ont été effectués par le groupe tripartite ISO/FIL/AOAC sur l'*Harmonization microbiologique*, du Comité Permanent chargé des *Méthodes d'analyse microbiologiques*, sous l'égide de son chef de projet, Dr J. Floor (ZA).

## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 8553:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ebc4dcc-9743-4f25-b66d-997d92989f06/iso-8553-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ebc4dcc-9743-4f25-b66d-997d92989f06/iso-8553-2004>

# Lait — Dénombrement des micro-organismes — Méthode de l'anse calibrée en boîtes de Petri à 30 °C

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode d'estimation des micro-organismes dans le lait cru par la méthode de l'anse calibrée en boîtes de Petri à 30 °C.

## 2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 4833, *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes — Technique de comptage des colonies à 30 degrés C*

ISO 7218, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques*

ISO 8261|FIL 122, *Lait et produits laitiers — Lignes directrices générales pour la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*

ISO/TS 11133-1, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 1: Guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire*

ISO/TS 11133-2, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 2: Guide général pour les essais de performance des milieux de culture*

## 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

### 3.1

#### micro-organismes

bactéries, levures et moisissures formant des colonies dénombrables dans les conditions spécifiées dans la présente Norme internationale

## 4 Principe

**4.1** Une prise d'essai est prélevée à l'aide d'une anse métallique en utilisant un milieu de culture spécifique d'échantillon et une quantité d'échantillon définie.

**4.2** Incubation de ces boîtes en aérobiose pendant 72 h à 30 °C.

**4.3** Calcul du nombre de micro-organismes par millilitre d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues sur les boîtes (voir Article 10).

## 5 Diluants, milieu de culture et réactifs

### 5.1 Généralités

Voir l'ISO 7218 et l'ISO/TS 11133-1.

### 5.2 Diluants

Voir l'ISO 8261 | FIL 122.

### 5.3 Milieu de culture — Agar au lait pour comptage

#### 5.3.1 Composition

Extrait de levure	2,5 g
Digestat enzymatique de caséine	5,0 g
Poudre de lait écrémé <sup>a</sup>	1,0 g
Glucose anhydre (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	1,0 g
Agar	9 g à 18 g <sup>b</sup>
Eau	1 000 ml

<sup>a</sup> La poudre de lait écrémé doit être exempte de substances inhibitrices.

<sup>b</sup> Selon les propriétés gélifiantes de l'agar utilisé.

#### 5.3.2 Préparation

ISO 8553:2004

##### 5.3.2.1 Préparation à partir d'un milieu déshydraté disponible dans le commerce

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ebc4dcc-9743-4f25-b66d-9970298900/iso-8553-2004>

Suivre les instructions du fabricant, mais, dans tous les cas, ajouter la poudre de lait écrémé, même si le fabricant considère que cela n'est pas nécessaire. Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7,0 \pm 0,2$  à  $25\text{ °C}$ .

##### 5.3.2.2 Préparation à partir des composants de base déshydratés

Dissoudre et mélanger dans l'eau, dans l'ordre suivant, l'extrait de levure, le digestat enzymatique de caséine, le glucose et ensuite la poudre de lait écrémé. Le chauffage de l'eau facilite cette opération. Ajouter l'agar et porter à ébullition en remuant fréquemment jusqu'à ce que l'agar soit complètement fondu.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7,0 \pm 0,2$  à  $25\text{ °C}$ .

##### 5.3.2.3 Répartition, stérilisation et conservation

Répartir le milieu dans des tubes à essai (6.8) par quantités de 12 ml à 15 ml par tube, ou dans des fioles ou des flacons (6.9) d'une capacité non supérieure à 500 ml. Stériliser à l'autoclave (6.11) réglé à  $121\text{ °C}$ .

Si le milieu est utilisé immédiatement, le refroidir dans un bain d'eau (6.6) à une température comprise entre  $44\text{ °C}$  et  $47\text{ °C}$  avant utilisation.

Sinon, le conserver à l'abri de la lumière à  $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  pendant trois mois tout au plus dans des conditions ne provoquant aucun changement de sa composition et de ses propriétés. Avant de commencer l'examen microbiologique, pour éviter tout délai au moment de couler le milieu, faire fondre complètement le milieu dans un bain d'eau (6.6) à une température comprise entre  $44\text{ °C}$  et  $47\text{ °C}$  avant utilisation (voir 9.2.4).

Afin de contrôler la température du milieu et les autres exigences, voir l'ISO 7218.

### 5.3.3 Essai de performance pour l'assurance qualité du milieu de culture

Tester la performance du milieu selon l'ISO/TS 11133-2.

## 5.4 Solution désinfectante

Utiliser une solution d'hypochlorite de sodium contenant 50 mg/l à 100 mg/l de chlore actif ou un mélange 1:1 d'éthanol à 96 % et d'acétone. Préparer une solution désinfectante quotidienne.

## 6 Appareillage et verrerie

Utiliser l'équipement usuel de microbiologie (voir l'ISO 7218) et en particulier ce qui suit.

### 6.1 Verrerie

La verrerie jetable est une alternative à la verrerie réutilisable si elle a des spécifications appropriées. La verrerie réutilisable doit être capable de subir des stérilisations répétées et doit être inerte chimiquement.

### 6.2 Matériel d'ensemencement

#### 6.2.1 Composants

Cet assemblage d'équipements ne peut être acheté tel quel, mais il est possible de le constituer à partir des composants listés de 6.2.1.1 à 6.2.1.3. Un équipement automatique peut être également utilisé.

**6.2.1.1 Anse calibrée en fil de platine**, étalonnée pour prélever 0,001 ml, soudée à une aiguille de seringue Luer-lock. Couder le fil à 30° à environ 3 mm ou 4 mm de l'anse, l'anse s'ouvrant en direction du raccord.

NOTE Des anses d'ensemencement en fil de platine appropriées sont disponibles auprès de Gerber Instruments K. Schneider & Co. AG, Suisse<sup>1)</sup>.

À défaut, utiliser une anse, étalonnée à 0,001 ml, en fil de platine, de platine rhodié ou de platine iridié, d'un diamètre compris entre 0,4 mm et 0,5 mm, fixée à un fil d'une longueur de 60 mm à 70 mm. Couder le fil à 30° à environ 3 mm ou 4 mm de l'anse. Vriller l'extrémité opposée du fil à plusieurs endroits. Insérer l'extrémité vrillée dans une seringue Luer-lock de calibre 13, sectionnée à environ 24 mm à 26 mm du point où le corps de la seringue pénètre dans le raccord, jusqu'à ce que la courbure se trouve à environ de 12 mm à 14 mm de l'extrémité du corps.

Vérifier régulièrement l'étalonnage de l'anse et ainsi la justesse de la méthode en procédant à l'analyse de 25 échantillons en double, à la fois par la méthode normalisée de dénombrement sur gélose (voir l'ISO 4833) et par la méthode de l'anse en boîtes de Petri.

Il convient d'obtenir des résultats de dénombrement sur boîtes de Petri compris entre 10 et 300 en accord avec la méthode normalisée de dénombrement sur gélose (troisième dilution décimale). Il convient que les moyennes des comptages, obtenus par les deux méthodes, ne s'écartent pas de plus de  $\pm 10\%$ .

**6.2.1.2 Appareil de pipetage en continu**, d'une capacité de 2 ml, muni d'un embout Luer-lock (par exemple une seringue à remplissage automatique Socorex ou Cornwall<sup>1)</sup>), réglable pour délivrer 1,0 ml.

---

1) Les boucles d'inoculation en platine de Gerber Instruments, Socorex ou les seringues à remplissage automatique Cornwall et les flacons à capuchon vissé en polypropylène Schott-Duran constituent des exemples de produits disponibles dans le commerce. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

**6.2.1.3 Tuyau en silicone**, d'un diamètre interne de 3,0 mm, d'une longueur suffisante pour permettre une prise d'échantillons aisée, fixé à la seringue et pénétrant dans un récipient bouché contenant du diluant.

NOTE Certaines seringues disponibles dans le commerce sont fournies avec un morceau de tuyau en silicone, un plongeur et une aiguille de distribution comme accessoires standards.

## 6.2.2 Assemblage et stérilisation du matériel d'ensemencement

Fixer l'aiguille hypodermique munie de l'anse calibrée en fil de platine (6.2.1.1) à l'appareil de pipetage en continu (seringue à remplissage automatique) (6.2.1.2). Raccorder le tube en silicone (6.2.1.3) au clapet d'entrée de la seringue à remplissage automatique et l'autre extrémité fixée au plongeur est placée dans le récipient de diluant (6.3).

Remplir le récipient de diluant (6.3) à environ 50 % à 80 % de sa capacité avec le diluant approprié (5.2).

Stériliser l'appareil de pipetage en continu à l'autoclave (6.11) réglé à 121 °C pendant 15 min et le laisser refroidir.

**6.3 Récipient de diluant bouché**, d'une capacité de 1 000 ml [un flacon Schott-Duran<sup>1)</sup> muni d'un bouchon vissant en polypropylène, par exemple]. Un petit orifice doit être pratiqué dans le bouchon pour permettre le passage du tuyau en silicone. Il est recommandé de fixer un tube à essai ou tout autre dispositif approprié au récipient pour soutenir et protéger l'anse pendant la stérilisation.

**6.4 Étuve**, réglable à 30 °C ± 1 °C.

**6.5 pH-mètre**, exact à ± 0,1 unité de pH à 25 °C.

**6.6 Bain d'eau**, réglable à une température comprise entre 44 °C et 47 °C.

**6.7 Dispositif de comptage des colonies**, composé, par exemple, d'une table lumineuse avec un fond sombre équipé d'une loupe réglée sur un grossissement de ×1,5 et d'un compteur numérique électronique ou mécanique. Il est également possible d'utiliser un compteur automatique de colonies (analyseur d'image).

**6.8 Tubes à essai**, d'environ 20 ml de capacité, équipés de bouchons appropriés.

**6.9 Fioles ou flacons**, d'une capacité non supérieure à 500 ml, équipés de bouchons appropriés.

**6.10 Boîtes de Petri**, en verre ou en plastique, stérilisées, de 90 mm à 100 mm de diamètre.

**6.11 Autoclave**, réglable à 121 °C ± 1 °C.

## 7 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ni modifié lors du transport et de la conservation.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 707.

## 8 Préparations

### 8.1 Préparation des échantillons

**8.1.1** Préparer les échantillons en évitant l'exposition à la lumière directe et en prenant toutes les précautions aseptiques utiles.



**8.1.2** Si les échantillons sont réfrigérés, les chauffer à une température comprise entre 15 °C et 20 °C avant essai.

**8.1.3** Agiter soigneusement et vigoureusement les échantillons. Pour garantir un mélange adéquat, éviter de trop remplir les flacons d'échantillons (environ 10 mm de vide suffit).

**8.1.4** Laisser reposer 5 min pour que la mousse se disperse et mélanger de nouveau avec précaution en renversant les flacons à deux ou à trois reprises juste avant l'étape suivante (9.2.1). Le temps entre le démarrage de la procédure de chauffage (8.1.2) et l'étape d'incubation (9.2.1) ne doit pas excéder 20 min.

## **8.2 Préparation du matériel d'ensemencement à l'anse calibrée**

**8.2.1** Enfoncer rapidement le piston de la seringue (6.2.2) à plusieurs reprises afin d'amorcer la seringue en verre (réglée pour délivrer 1 ml).

**8.2.2** Avant de commencer le premier transfert d'une série d'analyses, immerger l'anse 30 s dans une solution désinfectante (5.4). Expulser au rebus plusieurs doses de 1 ml de diluant, puis expulser une dose de 1 ml dans une boîte de Petri stérile (6.10). Étiqueter cette boîte «Témoin stérile des instruments».

## **9 Mode opératoire**

### **9.1 Généralités**

Ne pas procéder aux opérations décrites en 9.2 à la lumière directe du soleil. Prendre les précautions normales aseptiques chaque fois que cela est nécessaire.

### **9.2 Ensemencement et incubation**

**9.2.1** Plonger l'anse fraîchement préparée (voir 8.2.2) dans l'échantillon d'essai préparé (voir 8.1.4) jusqu'à la partie courbée du fil (la courbure sert de trait de graduation et permet aussi de retirer l'anse verticalement). Enfoncer l'anse dans le lait à la même profondeur sur une distance d'au moins 20 mm, puis retirer doucement et régulièrement à une vitesse d'environ 2 cm/s.

Vérifier soigneusement la vitesse de retrait de l'anse de la surface du lait, car cette opération influe sur le volume de la prise d'essai. Un retrait trop lent de l'anse provoque l'adhésion de moins de 0,001 ml à celle-ci, tandis qu'un retrait soudain de l'anse provoque l'adhésion de plus de 0,001 ml à celle-ci. Pour faciliter la manipulation, utiliser des flacons d'échantillon à col large et opérer sous un bon éclairage.

**9.2.2** Soulever le couvercle d'une boîte de Petri stérile (6.10). Insérer l'anse et abaisser le piston pour provoquer l'écoulement de 1 ml de diluant stérile sur l'anse chargée et entraîner ainsi une quantité connue d'échantillon dans la boîte. Ne pas abaisser le piston trop rapidement pour éviter que le diluant ne passe au travers de l'anse sans suivre la tige.

**NOTE** En principe, il ne reste pas de quantité significative sur l'anse après l'expulsion de l'échantillon. Toutefois, des imperfections de la soudure de l'anse ou sur la surface du métal peuvent provoquer un rinçage incomplet, comme c'est notamment le cas pour les anses usagées abîmées.

Remplacer les anses très abîmées. Prendre la précaution de stériliser l'anse tous les 20 échantillons en l'immergeant dans une solution désinfectante (5.4). Ne pas stériliser l'anse à la flamme, cette méthode en réduit significativement la durée de vie. Expulser au rebus plusieurs doses de 1 ml d'échantillon avant de continuer les opérations.

**9.2.3** Immédiatement après chaque lot d'échantillons et avant de rincer ou stériliser l'anse, expulser 1 ml de solution tampon stérile dans une boîte de Petri. Étiqueter cette boîte «Témoin de rinçage». Il ne convient pas que plus de deux colonies se développent dans cette boîte durant l'incubation (9.2.6). De plus, verser le milieu de culture (5.3) seul dans l'une des boîtes de Petri stériles. Étiqueter cette boîte «Témoin de milieu».